

EPO3/11024

Rec'd PCT/PTO 01 APR 2005

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N. MI2002 A 002118

REC'D 23 FEB 2004
WIPO PCT

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

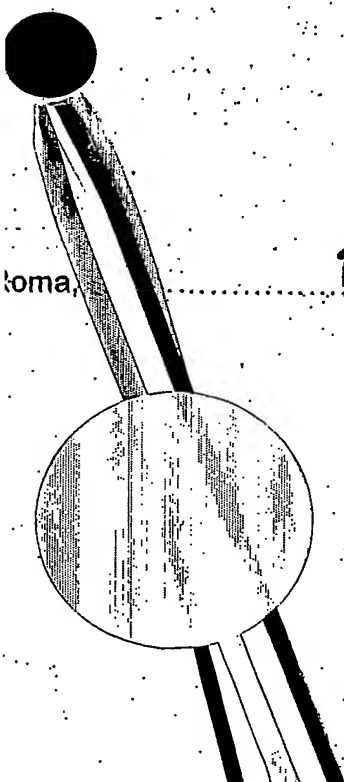
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



14 OTT. 2003

IL DIRIGENTE
Paola Giuliano

Dr.ssa Paola Giuliano



AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A-3

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **ABIOGEN PHARMA S.p.A.**Residenza **OSPEDALETTO (PI)**codice **01466740504**

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr. Diego Pallini ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**via **C.so di Porta Vittoria**n. **9**città **Milano**cap **20122**(prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) **C12N**

gruppo/sottogruppo

Procedimento per la coltura su larga scala di T-linfociti in un sistema omogeneo

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **TRASCIATTI Silvia**3) **CAVENAGHI Luigi**2) **NOLLI Maria Luisa**4) **DE BERNARDI Nadia**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) **nessuna**

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ **PROV** n. pag. **33**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare).....

Doc. 2) ☒ **PROV** n. tav. **01**

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare).....

Doc. 3) ☒ **RIS**

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale.....

Doc. 4) ☒ **RIS**

designazione inventore.....

Doc. 5) ☒ **RIS**

documenti di priorità con traduzione in italiano.....

Doc. 6) ☒ **RIS**

autorizzazione o atto di cessione.....

Doc. 7) ☒

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

DUECENTONOVANTUNO/80.-COMPILATO IL **04/10/2002**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Diego Pallini

obbligatorio

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO MILANO**codice **155**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 002118

Reg. A.

L'anno **DUEMILADUE****QUATTRO**del mese di **OTTOBRE**

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto di n.

☒ fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
M. CONTONFESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRELIMINARE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI2002A 002

REG. A

DATA DI DEPOSITO

10 2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

D. TITOLO

Procedimento per la coltura su larga scala di T-linfociti in un sistema omogeneo

L. RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda un procedimento per l'amplificazione su larga scala di linee cellulari linfocitarie umane per uso terapeutico, costituito da un sistema omogeneo di coltura.

Il procedimento dell'invenzione riguarda inoltre la produzione di dosi terapeutiche di cellule linfocitarie coltivate in modo omogeneo.



M. DISÉGNO

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Procedimento per la coltura su larga scala di T-linfociti in un sistema omogeneo

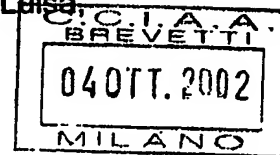
a nome di: ABIOTEN PHARMA S.p.A.

con sede in: OSPEDALETTO (PI)

Inventori designati : TRASCIATTI Silvia, NOLLI Maria Luisa,

CAVENAGHI Luigi, DE BERNARDI Nadia

MI 2002 A 002118



CAMPO DELL'INVENZIONE

Il campo tecnico dell'invenzione è quello della coltura cellulare *in vitro* ed espansione di cellule umane isolate su scala industriale.

TECNICA ANTERIORE

Uno degli approcci della terapia antitumorale è basato sull'utilizzo di linee cellulari o cellule isolate ex-vivo dotate di attività citotossica.

Nei primi anni '90 furono isolate alcune linee cellulari di linfociti T derivati da pazienti pediatrici portatori di leucemia T-linfoblastica acuta denominate TALL (T-cell-acute lymphoblastic leukemia) che comprendono le linee TALL-104, TALL-107, TALL-103/2, descritte in O' Connor et al. , 1991, Blood 77, 1534:1545 ed in Cesano e Santoli (In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28: 648-656) ed aventi caratteristiche di particolare interesse, tant'è che sono attualmente utilizzate con successo nella terapia di tumori in diversi modelli animali e nell'uomo (Cesano et al. Blood 87:393-403; Cesano et al Cancer Res., 1996, 56:3021-3029, US 5,272,082; US 5,683,690; US 5,702,702).

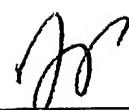
Le linee cellulari TALL possiedono un'attività citotossica specificamente

antitumorale e sono attive su diversi tipi di tumori: la caratteristica principale di queste cellule è che non sono MHC ristrette (Cesano et al. J. Immunol., 1993, 151: 2943-2957) e possono quindi essere utilizzate in tutti i pazienti indipendentemente dal fenotipo degli antigeni di istocompatibilità. Inoltre, al contrario di alcuni tipi di linfociti dotati di attività citotossica, quali ad esempio i TIL ed i LAK, utilizzati allo stesso scopo, non necessitano di un concomitante trattamento con linfochine dopo la loro somministrazione in vivo, cosa che rappresenta un ulteriore vantaggio dell'uso di queste cellule in quanto la contemporanea somministrazione di linfochine presenta diversi inconvenienti.

Grazie a questi vantaggi ed al fatto che i linfociti TALL sono stati sperimentati con successo in diverse patologie tumorali essi sono considerati un'alternativa terapeutica interessante: al momento attuale risultano tuttavia limitanti i sistemi di espansione cellulare utilizzati: le cellule preparate per la immunoterapia adottiva (*adoptive immunotherapy*) derivano infatti da colture cresciute in singole fiasche come descritto in: Cesano et al. Cancer Res., 1996 56: 4444-4452; Visonneau et al. Clin. Cancer Res, 1997, 3:1789-1797. Ciò accade nonostante siano utilizzati da tempo apparati per colture cellulari su scala industriale come quelli per la preparazione di anticorpi monoclonali e di proteine ricombinanti. Pertanto un sistema di coltura su scala industriale adatto a questo tipo di cellule è altamente desiderabile.

SOMMARIO

L'invenzione ha per oggetto un procedimento per espandere e crescere in coltura linfociti TALL in quantità industriale utilizzando un sistema di



coltura omogeneo. Per quantità industriale di linfociti TALL è intesa una quantità pari ad almeno 1×10^9 cellule.

In particolare il procedimento utilizza come fermentatore o sistema omogeneo la cell-factory, preferibilmente a 10 ripiani. I linfociti espandibili secondo questo procedimento sono scelti nel gruppo costituito da: TALL-104, TALL-107, TALL-103/2, opzionalmente geneticamente modificati.

In accordo con un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda inoltre un procedimento di preparazione di cellule per campionamento delle dosi terapeutiche di cellule prodotte in accordo con il primo aspetto dell'invenzione, costituito dalla saldatura del collarino di riempimento che genera almeno una camera campionatrice contenente un numero di cellule sufficiente per il campionamento delle cellule contenute nella sacca.

Descrizione delle figure

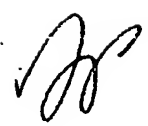
Figura 1. Grafico relativo ai livelli di glucosio ed alla densità cellulare di TALL cresciute in fiasca.

In 15 fiasche di TALL furono determinati i seguenti parametri: numero di cellule/ml (-♦-) e livelli di glucosio (barra piena).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda un procedimento per espandere a livello industriale i linfociti TALL caratterizzato dal fatto che una coltura di cellule costituita da almeno 1×10^9 cellule vengono cresciute in un sistema omogeneo costituito da un'unica unità fermentativa.

I linfociti TALL (T-cell-acute lymphoblastic leukemia) sono costituiti da



linee di linfociti T citotossici derivati da un paziente pediatrico con leucemia linfoblastoide e comprendono le linee TALL-104, TALL-107, TALL-103/2, come descritte in O' Connor et al., 1991, Blood 77, 1534:1545; Cesano e Santoli, In Vitro Cell. Dev. Biol., 1992, 28: 648-656). La linea cellulare è ancor più preferibilmente la linea TALL-104. Tali linee cellulari possono anche essere modificate geneticamente.

Finora queste linee cellulari sono state amplificate solo in fiasche singole fino ad un massimo ottenibile di circa 1×10^8 cellule/fiasca T175.

Pertanto la preparazione di sacche contenenti quantità terapeuticamente efficaci di cellule, comprese tra 10^5 e 10^{12} cellule, preferibilmente comprese tra 1×10^7 e 1×10^{10} ancor più preferibilmente comprese tra 1×10^8 e 2.5×10^9 , comportava l'amplificazione contemporanea di un numero molto alto di fiasche singole.

La crescita in fiasche singole rappresenta un sistema di coltura eterogeneo in quanto ogni fiasca rappresenta un micro-sistema colturale diverso. In accordo con ciò e adeguandosi alle linee guida FDA "Guidance for Industry: Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy." (CBER, March 1998, Punto III) del Dipartimento per la salute US, che consiglia controlli separati per ogni miscela di cellule preparata in un sistema indipendente, cellule derivanti da ogni singola fiasca costituiscono un lotto diverso e diventano quindi oggetto di controlli indipendenti. Pertanto lo sviluppo di una sistema di coltura omogeneo per cellule di utilizzo in terapia ed in particolare per le TALL, rappresenta un enorme guadagno anche dal punto di vista dei controlli di lotto.



L'amplificazione in un sistema eterogeneo costituito da numerose fiasche singole, presenta inoltre un elevato rischio di sterilità per le numerose manipolazioni effettuate dall'operatore.

Le cellule TALL crescono in sospensione ma, sorprendentemente, non possono essere amplificate o espanse nei sistemi noti per lo scale-up industriale di tali tipi di cellule, quali ad esempio la Spinner-flask o il fermentatore del tipo Miniperm. Quindi, quando la quantità di cellule da produrre è superiore a 10^9 cellule, come ad esempio per la produzione di dosi terapeutiche pari ad almeno 2.5×10^9 cellule, l'espansione diventa estremamente laboriosa, poiché le fiasche più grandi (T175) permettono di ottenere al massimo $1.5-2 \times 10^8$ cellule TALL.

Sorprendentemente è stato osservato che queste cellule possono crescere ed essere espanse efficientemente in un sistema omogeneo quale la cell-factory, normalmente utilizzata per cellule anchorage-dependent. Al contrario la spinner-flask o altri tipi di fermentatori convenzionalmente utilizzati per la crescita su larga scala di cellule in sospensione ad esempio ibridomi aventi caratteristiche di crescita simili alle TALL, non risultano adatti.

Per produzione su scala industriale è intesa la produzione di almeno 1×10^9 cellule TALL in un sistema omogeneo.

Nel procedimento dell'invenzione, i dati relativi al numero di cellule vanno considerati come comprendenti sempre una tolleranza di circa il 5% che rappresenta il possibile errore di misurazione che si ha con la camera di Burker. Ad esempio l'indicazione di un n° di cellule pari a 1×10^6 , è in realtà relativo ad una quantità di cellule compresa tra



0.95×10^6 e 1.05×10^6 cellule. L'errore di misurazione è a sua volta variabile e dipende dal metodo con cui è effettuata la misurazione.

L'espansione in cell-factory in accordo con il procedimento dell'invenzione, viene preferibilmente preceduta da una fase di pre-espansione che comprende una serie di espansioni volumetriche nella stessa fiasca (o contenitore per colture cellulari) mediante aggiunte successive di terreno fresco completo alla coltura già in atto, insieme con passaggi di trasferimento dell'intera coltura in fiasche aventi capacità di volume superiori, fino al trasferimento della coltura in fiasche del massimo volume e superficie esistenti in commercio, quali le T175.

Secondo un aspetto preferito la pre-espansione è effettuato fino all'ottenimento di un numero di cellule pari ad almeno $2-2.5 \times 10^8$ che vengono utilizzate per l'inoculo in ciascuna cell-factory + un n° di cellule pari ad almeno di $1-1.5 \times 10^8$ che vengono mantenute parallelamente in coltura in fiasche T175.

Con il termine passaggio si intende la divisione (splitting) della coltura cellulare effettuata per riportare i valori di densità cellulare ai valori ottimali di inoculo, compresi tra $0.7-1 \times 10^8$ cellule/ml.

A questa densità le cellule raggiungono velocemente una densità di circa 2.5×10^9 cellule/ml. La fase di pre-amplificazione viene preferibilmente effettuata in terreno completo, preferibilmente IMDM, contenente Glutamina 2 mM, siero fetale bovino (FBS) in concentrazione compresa tra 2 e 20%, preferibilmente 5% e con l'aggiunta di citochine, preferibilmente interleuchine, ancor più preferibilmente IL-2 o IL-15. Nel caso di IL-2 l'aggiunta è di 100 IU/ml



ogni 48-72 ore. Nella fase di amplificazione nel sistema omogeneo il terreno è lo stesso della fase di pre-amplificazione ma il siero fetale bovino è sostituito almeno parzialmente da siero umano AB. Tale parziale sostituzione può essere già effettuata negli ultimi passaggi della fase di preamplificazione. Altri terreni di crescita possono essere utilizzati in sostituzione all'IMDM, quali ad esempio l'RPML, l'Ham's-F12 etc. Il terreno non contiene antibiotici.

Per terreno completo è inteso terreno, preferibilmente IMDM comprendente glutammina 2mM, ma senza antibiotici: ad esso può essere addizionato FBS o siero umano.

Interleuchine, preferibilmente IL-2 o IL-15, devono essere addizionate al terreno ogni 48-72 ore, ad una concentrazione finale compresa tra 50 e 150 IU/ml, ancor più preferibilmente 100 IU/ml.

Le cellule sono incubate a 37°C ed in miscela di aria, contenente dal 5 al 12%, preferibilmente 10%, di CO₂. Tutti i passaggi che prevedono la manipolazione delle cellule o dei loro terreni di coltura sono effettuati in condizioni di sterilità, ad esempio sotto cappa Biohazard a flusso laminare verticale (classe 100).

In un suo aspetto particolarmente preferito la fase di pre-amplificazione comprende lo scongelamento in bagno termostato a 37°C di un tubo o vial congelata di una coltura di Master Cell Bank (MCB) conservata in azoto liquido e contenente da 1×10^7 a 2×10^7 cellule/tubo/ml.

Sotto cappa a flusso laminare al contenuto della vial viene aggiunto un volume pari a circa 8-10 volte il suo volume di soluzione di scongelamento (IMDM completo + 20% FBS) fredda. Le cellule vengono

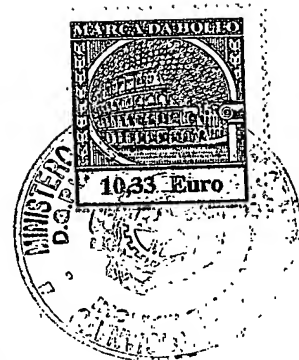


centrifugate a 1500 rpm per 10 min. Dopo aspirazione del sopranatante vengono aggiunti al pellet di cellule 10 ml di terreno completo e le cellule così risospese sono trasferite in una fiasca T25. Si aggiunge IL-2 diluita in terreno completo in modo da avere una concentrazione finale di 100 IU/ml. La coltura cellulare viene espansa nel doppio del volume di terreno (e amplificata in 2 fiasche T25) quando viene raggiunta una densità tale per cui le cellule occupano tutta la superficie della fiasca come osservabile al microscopio invertito, aggiungendo un uguale volume di terreno fresco e dividendo la coltura in due fiasche uguali per ripristinare la densità cellulare ottimale (densità cellulare di inoculo), generalmente compresa tra $0.7-1 \times 10^6$ cell/ml ed un volume per fiasca corrispondente al volume iniziale.

Per mantenere uno scambio ottimale di gas nel terreno di coltura, si considera quale volume ottimale di una fiasca T25, un volume di terreno compreso tra 7-12 ml, preferibilmente 10 ml, di una T75 un volume compreso tra 20 e 60 ml, preferibilmente 40, di una T175 un volume compreso tra 40 e 200 ml. I volumi indicati sono approssimativi e relativi a condizioni di densità cellulare ottimale.

Nella fase successiva allo scongelamento, la densità cellulare ottimale viene raggiunta dopo un certo numero di giorni compreso tra 3 e 7, preferibilmente 5. Dopo circa 3 giorni le cellule sono trasferite dalle 2 fiasche T25 a 2 fiasche T75, raccogliendo anche le cellule eventualmente rimaste nella fiasca ed aggiungendo sempre IL-2 in proporzione nel terreno fresco.

Dopo circa 3 giorni le cellule sono trasferite da 2 fiasche T75 a 2 fiasche



T175. Le eventuali cellule rimaste nelle T75 vengono raccolte con un lavaggio in terreno completo in modo da raggiungere un volume finale di 40 ml e aggiungendo IL-2 in proporzione. Dopo 2-3 giorni le cellule sono trasferite da 2 fiasche T175 in 4 fiasche T175 in un volume di 20 ml ai quali vengono aggiunti subito altrettanti ml di terreno completo e IL-2 in proporzione. Dopo 2 giorni le cellule sono trasferite dalle 4 fiasche T175 in 8 fiasche T175. Ad ogni fiasca T175 sono aggiunti circa 20 ml di terreno completo e IL-2 in proporzione. Dopo circa 2 giorni vengono aggiunti alle 8 flask T175 circa 40 ml di terreno completo contenente siero umano in percentuale compresa tra il 2 ed il 10%, preferibilmente compresa tra 4%-6%, ancor più preferibilmente al 5% e IL-2 in proporzione. Dopo 2 giorni vengono aggiunti alle 8 fiasche T175 circa 80 ml di terreno completo contenente IL-2 in proporzione.

Il volume finale di raccolta in fiasca T175 viene mantenuto compreso tra 140-180 ml. La fase di pre-amplificazione si conclude dopo circa 15 giorni con un numero di cellule compreso tra 0.9×10^9 a 1.1×10^9 (valore corrispondente in genere a 8 fiasche T175 contenenti circa 160 ml di sospensione cellulare ciascuna) in terreno contenente siero umano in concentrazione finale compresa tra 2 e 5%, preferibilmente compresa tra 3 e 4%, ed opzionalmente di siero fetale bovino (FBS) in concentrazione finale compresa tra 0 e 5%, preferibilmente compresa tra 1.5 e 3%.

Il passaggio tra terreno contenente FBS e terreno contenente siero umano avviene preferibilmente già negli ultimi due passaggi della fase di pre-amplificazione in fiasca, preferibilmente T175, preferibilmente per



diluizioni successive di colture contenenti FBS con terreno fresco contenente siero umano.

L'inoculo in cell-factory è effettuato con un numero di cellule compreso tra 1.5 e 2.5×10^7 /ripianto in un volume compreso tra $1/6$ ed $1/10$, preferibilmente $1/8$ di capacità finale della cell-factory. Per l'inoculo in cell-factory da 10 ripiani e 2 litri finali di capacità, l'inoculo è quindi effettuato con una quantità di cellule totale compresa tra 1.5 e 2.5×10^8 cellule in un volume di terreno compreso tra 200 e 330 ml di terreno, preferibilmente 230-270, al quale viene subito aggiunto un volume uguale di terreno fresco completo, contenente siero umano in quantità inferiore al 10%, preferibilmente al 5% e citochine, preferibilmente interleuchine, ancor più preferibilmente IL-2 o IL-15, preferibilmente IL-2 ad una concentrazione finale compresa tra 80 e 120 IU/ml, preferibilmente 100 IU/ml.

Ogni 3-5 giorni, preferibilmente 4, periodo di tempo nel quale le cellule generalmente duplicano, viene aggiunto un volume di terreno completo corrispondente a quello contenuto nella cell-factory per continuare l'espansione e la crescita cellulare fino al volume finale massimo di 2 litri per una cell-factory a 10 ripiani, e ad un numero di cellule compreso tra 1.5 e 2.5×10^9 cellule. L'amplificazione di cellule TALL in cell-factory prevede l'aggiunta di terreno fresco contenente siero umano in percentuale inferiore al 10%, preferibilmente compresa tra 3-7%, ancor più preferibilmente tra 4-6%, meglio se al 5%; quindi nella fase di amplificazione nel sistema omogeneo di coltura il siero fetale bovino viene preferibilmente non usato e le tracce eventualmente presenti alla



fine del procedimento dell'invenzione sono quindi relative alle diluizioni successive del terreno contenente FBS con quello contenente siero umano.

In sintesi, secondo uno schema generale di procedimento sia nella fase di pre-amplificazione in fiasca che nella fase di espansione nel sistema omogeneo, la densità cellulare alla fine dell'inoculo non è mai inferiore a 0.7×10^6 cellule/ml (corrispondente a quanto ottenibile dividendo la coltura cellulare 1:2 o 1:3 ogni 48-72 ore) ed è preferibilmente di 0.75×10^6 /ml, mentre nella fase finale di crescita, poco prima della raccolta di cellule non supera mai il valore di 2×10^6 ed è preferibilmente di 1.5×10^6 /ml.

Proporzionalmente sono calcolati i volumi ed il numero di cellule per il procedimento dell'invenzione in cui l'inoculo è effettuato in una cell-factory a 40 ripiani, avente capacità massima di 8 litri di terreno, in grado di fornire una quantità totale di cellule cresciute in un unico sistema omogeneo, pari a circa $8-10 \times 10^9$ cellule.

In accordo con il metodo della presente invenzione ogni sacca contenente la dose terapeutica maggiore di cellule, pari a 2.5×10^9 cellule (sacche contenenti da 1×10^8 a 2.5×10^9 cellule), è prodotta con un sistema omogeneo di coltura. Pertanto secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda un procedimento per la preparazione di sacche congelate di linfociti TALL in quantità di almeno 1×10^9 cellule caratterizzato dal fatto che le cellule sono espanse in una coltura omogenea. Le sacche utilizzate sono di volume variabile e possono quindi contenere dosi terapeutiche di cellule diverse. Preferibilmente



sono utilizzate sacche per sia per congelamento che infusione, preferibilmente Baxter Cryocyte.

Il contenuto di cellule della cell-factory è riunito in un tubo sterile da 50 ml e quindi irraggiato, secondo metodi noti, in un acceleratore di particelle beta (Betatrone). Il metodo è validato in modo da fornire una quantità di particelle pari a quelle erogate da una sorgente tradizionale come Cs137. Il metodo che utilizza il betatrone ha il vantaggio di non essere radioattivo e di irraggiare la soluzione in modo uniforme. Una volta irraggiate le cellule sono centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti. Un campione di cellule è prelevato a questo punto per i test qualitativi sulle cellule.

Le cellule irraggiate vengono trasferite sotto cappa a flusso laminare insieme ai componenti della sospensione finale e alle sacche sterili. Le cellule vengono risospese nella soluzione di congelamento costituita dal 20% Rimso 50 (DMSO 50%) e dall' 80% di albumina umana al 5% in una quantità di terreno compresa tra 8 e 30 ml, ancor più preferibilmente tra 10 e 25 ml di terreno completo contenenti dosi di cellule TALL comprese tra 1×10^8 a 2.5×10^9 . Preferibilmente la densità cellulare nella sacca è compresa tra 10^6 e 10^8 cellule/ml. Le cellule irradiate possono essere mantenute a 4°C per non più di 24 ore prima del congelamento.

La concentrazione cellulare viene valutata con la conta al microscopio nella camera di Burkner, oppure con altri metodi noti al tecnico del ramo. Le sacche vengono riempite sterilmente.

Dopo il riempimento, le sacche vengono sigillate avendo cura di saldare,



ad esempio mediante calore, in almeno due punti, preferibilmente tre, il collarino di riempimento della sacca, in modo tale da creare almeno una o preferibilmente due camere contenenti cellule, che denominiamo campioni autentici ai fini della presente invenzione, contenenti aliquote di cellule separate della sacca ma derivanti dallo stesso batch di coltura.

In accordo con una realizzazione preferita, il volume della sospensione cellulare contenuto nelle camere del collarino è compreso tra 0.1 e 1 ml, preferibilmente 0.3 ml, ed il numero di cellule per camera è sufficiente per almeno una serie dei controlli di qualità e/o sterilità opportuni. Le cellule che trovano nella/e camera/e corrispondenti ai campioni autentici sono facilmente prelevabili senza il bisogno di aprire la sacca intera.

Tali camere, il metodo di saldatura in più punti del collarino ed il procedimento di formazione dei campioni autentici della sacca, rappresentano quindi gli ulteriori oggetti dell'invenzione.

Le sacche per crioconservazione ed infusione sono quindi congelate a -80°C.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda un procedimento per la preparazione di sacche congelate di linfociti TALL in quantità di almeno 1×10^9 cellule caratterizzato dal fatto che tale quantità deriva da un singolo sistema di coltura omogeneo.

I controlli di qualità sulle cellule amplificate con il processo dell'invenzione, possono essere effettuati prima del congelamento, al momento della raccolta di cellule dal sistema omogeneo di coltura ed anche successivamente al congelamento, per verificare la stabilità di proprietà quali ad esempio le percentuali di marcatori immunologici e di



attività biologica del prodotto finito di cellule TALL. Le cellule prodotte secondo l'invenzione risultano essere stabili anche dopo congelamento. I controlli di qualità preferibilmente comprendono le seguenti misurazioni, effettuate secondo metodi noti nell'arte:

- vitalità, preferibilmente effettuata con un test d'esclusione con Trypan Blu e deve essere superiore o uguale all'80 %,
- attività biologica , preferibilmente effettuata con un test di citotossicità (misura dell'adenilato kinasi), che deve essere superiore al 60 % lisi delle Cellule Target K562 in rapporto 10/1, anche se altri saggi possono essere utilizzati per misurare l'attività biologica del prodotto,
- livelli di endotossine, preferibilmente effettuati con il test colorimetrico Lymulus Amebocyte Lysate che deve risultare inferiore a $\leq 0,5$ EU/mL;
- fenotipo marcatori immunologici, preferibilmente misurato per Immunofluorescenza (FACS) che deve dare valori di almeno il 90 % per i marcatori: CD3⁺, CD8⁺, CD56⁺,
- proliferazione, preferibilmente effettuata con il test dell'incorporazione di ³H-TdR e che deve dare una proliferazione misurata ad almeno 72 ore, inferiore o uguale a due volte il valore del fondo.

Con il metodo della presente invenzione, inoltre la variabilità delle misurazioni effettuate come controllo di prodotto sui marcatori immunologici, l'attività biologica, e dei marcatori metabolici quali ad esempio il glucosio del terreno di coltura, è inferiore rispetto a quanto misurato per cellule cresciute in un sistema di coltura eterogeneo.



Nel sistema omogeneo di coltura in cell-factory, infatti, la percentuale dei marcatori immunologici espressi sulle cellule TALL è per il CD3⁺ e CD56⁺ superiore al 98%, per il marcatore CD8⁺ superiore al 93%, mentre risulta essere mediamente superiore al 90% per cellule cresciute in fiasca. L'espressione del marcatore CD56 superiore o uguale al 95%, preferibilmente superiore al 97%, risulta particolarmente elevata rispetto a quella di cellule cresciute nel sistema eterogeneo costituito da fiasche.

Anche l'attività biologica, misurata mediante saggio di citotossicità su cellule target, preferibilmente K562, risulta essere superiore al limite di accettabilità e comunque sempre superiore al 70% del controllo, costituito da un numero di cellule opportuno dove la lisi è stata indotta completamente.

Anche la misurazione dei livelli di glucosio dimostra che le condizioni metaboliche delle cellule sono omogenee in cell-factory al contrario di quanto accade in fiasca (vedi figura 1): infatti mentre le misurazioni in fiasca riportano valori di concentrazione di glucosio compresi tra 300 e 400 mg/dl, quelle effettuate in cell factory danno valori compresi entro un range di 350-380 mg/dl.

Secondo una realizzazione semplificata il procedimento dell'invenzione comprende una qualsiasi fase di preamplificazione della coltura cellulare di TALL, effettuata secondo metodi noti nell'arte, tale da avere una quantità di cellule per l'inoculo in cell-factory, pari a 2×10^7 /ripianto x n° ripiani della cell-factory, in un volume iniziale compreso tra 1/10-1/6 del volume finale della cell-factory ed una fase di amplificazione in cell factory, preferibilmente a 10 ripiani (con capacità di circa 2 L finali), con



un inoculo totale di cellule pari a circa 2×10^8 in circa 250 ml.

Nelle condizioni utilizzate secondo il presente procedimento nella fase industriale di espansione in cell-factory, si ha una ottimizzazione del rapporto tra densità minima di inoculo e massima di recupero alla fine del ciclo di espansione. Infatti, con il metodo della presente invenzione, alla fine del ciclo di espansione il numero di cellule è all'incirca decuplicato (da 1.5 a 2.5×10^8 cellule a 1.5 a 2.5×10^9 cellule), mentre il volume è solo 8 volte superiore. Il sistema di coltura omogeneo presenta inoltre i seguenti vantaggi: 1) eliminazione dell'eterogeneità delle condizioni di crescita delle cellule, 2) riduzione del numero di manipolazioni con conseguente riduzione della possibilità di contaminazione 3) riduzione del tempo uomo e costi personale.

È inoltre un vantaggio del procedimento secondo l'invenzione che deriva dalla diminuzione dei rischi di contaminazione rispetto ai sistemi di coltura che utilizzano fiasche multiple, l'uso di un terreno di coltura privo di antibiotici.

Un ulteriore vantaggio del procedimento secondo l'invenzione è inoltre l'utilizzo di una concentrazione di siero umano preferibilmente inferiore al 10%. Pertanto, secondo il procedimento dell'invenzione una buona amplificazione cellulare viene ottenuta con una concentrazione di siero umano preferibilmente compresa tra 4-6%.

La fase di espansione in cell-factory rende quindi l'intero procedimento di preparazione della sacca per l'uso terapeutico di TALL ottimizzato e di livello industriale.

I vantaggi del metodo di espansione della TALL secondo la presente



invenzione sono riassumibili quindi nella: limitazione dei controlli di qualità alla singola unità di campionatura che corrisponde alla singola unità produttiva (cell-factory), in confronto con un'espansione ottenuta per amplificazione di un numero molto maggiore di singole unità fermentative, lavorate in tempi diversi e quindi oggetto di possibili occasioni di contaminazione diverse; inoltre limitazione del numero di bioreattori utilizzati che consente un risparmio di circa il 30% di tempo e 25% di costi.

E' da notarsi infatti che in accordo con i metodi dell'arte nota per questo tipo di cellule, il quantitativo di 2.5×10^9 cellule corrispondente a circa a 25 sacche da 10^8 cellule o a 1 sacca da 2.5×10^9 era ottenuto con 35 T175 e con un volume pari a 2.8L di terreno completo. Il risparmio in materie prime (siero umano, terreno, citochine) risulta quindi essere con il metodo della presente invenzione, pari a circa il 30%.

A tali stime approssimative va aggiunto il risparmio ottenuto sul numero di controlli effettuati sui lotti finali, rappresentati al massimo da 1×10^8 cellule nel sistema eterogeneo dell'arte nota ed ad un valore 10 volte superiore nel lotto prodotto mediante il procedimento comprendente il sistema omogeneo descritto nella presente invenzione. In termini pratici questo equivale ad numero di controlli dieci volte inferiore.

PARTE SPERIMENTALE

1. Materiali.

Fiasche: Falcon, Beckton Dickinson;

cell factory: n° cat 164327 or 170009, marca Nunc A/S Denmark

www.nuncbrand.com;



terreno di coltura: Iscove's Modified Dulbecco Medium, Biowhittaker 12-722 con aggiunta di glutamina;

CM: Complete Medium, contenente glutamina e siero;

siero Fetale Bovino: Foetal Bovine Serum di origine USA, Biowhittaker;

siero umano: Human Serum Type AB, Biowhittaker;

IL-2 Proleukin 1, Chiron;

soluzione salina: Phosphate Buffered Saline, Biowhittaker;

human Albumin 5%, Farma Biagini;

RIMSO 50, Baxter;

Sacche: Bags for cryopreservation and infusion, Cryocyte Baxter.

2. Metodi.

Tutte le colture cellulari furono eseguite in ambiente sterile, sotto cappa Biohazard disinfettando con isopropanolo o con la fiamma i beccucci di ingresso ad ogni aggiunta o prelievo.

2.1. Preparazione del terreno

I lotti di siero furono scomplementati in bagno termostatico per 1h a 56°C. Le bottiglie di siero scomplementato sono conservate a 4°C ed utilizzate entro un mese dalla data di scomplementazione.

2.2. Terreno completo per la fase di pre-amplificazione.

Alla bottiglia da 500 ml IMDM vennero aggiunti 50 ml di FBS scomplementato e la bottiglia venne identificata con il lotto. Il terreno completo fu conservato a 4°C e portato a temperatura ambiente prima dell'utilizzo. Il terreno completo fu utilizzato entro un mese dalla data di preparazione.



2.3. Terreno completo per lo scale up in cell-factory.

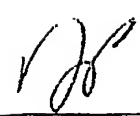
Alla bottiglia da 500 ml IMDM furono aggiunti 25 ml di siero umano AB scomplementato. Il terreno completo fu conservato a 4°C e portato a temperatura ambiente prima dell'utilizzo. Il terreno completo fu utilizzato entro un mese dalla data di preparazione.

2.4. Preparazione IL-2.

L'interleuchina (18×10^6 IU/fiala) venne risospesa in 20 ml di PBS in modo da avere ca 9×10^5 IU/ml: filtrare la soluzione così ottenuta con filtri 0.22 μ m e dispensare le fiale in aliquote da 1 ml. Conservare le aliquote a -80°C. Diluire 1 ml di questa soluzione in terreno completo (corrispondente al terreno del punto 1.2 per la fase di pre-amplificazione quindi in terreno corrispondente al punto 1.3. per la fase di amplificazione, in modo da avere una soluzione di 10^4 IU/ml. Questa soluzione va aggiunta alla sospensione cellulare diluendola 1/100 nel volume di coltura.

2.5. Controlli di procedimento

Bioburden: La determinazione della contaminazione microbica è effettuata sul terreno completo utilizzato per coltivare le TALL (IMDM + siero aggiunto). Il terreno così ottenuto viene filtrato con una membrana con pori 0,45 μ m, il filtro viene tolto con un bisturi sterile in terreno appropriato per la visualizzazione di contaminazione da microrganismi (il terreno utilizzato è Tryptic soy agar). Appoggiare il filtro sulla piastra. Incubare non meno di 3 giorni a 20-25 °C per rilevare la presenza di muffe e indi incubare non meno di 3 giorni a 30-35°C per rilevare la presenza di batteri. Le piastre sono visivamente ispezionate per



verificare la crescita di microrganismi che devono risultare inferiori a 100 CFU.

Monitoraggio microbiologico: Le cappe utilizzate per la lavorazione della TALL furono controllate per la presenza di microrganismi, durante il procedimento. Mentre l'operatore sta lavorando sulle cellule (travasi, riempimento di sacche), una piastra di Petri con TSB agar venne esposta all'interno della cappa e coperta al termine della lavorazione, quindi incubata non meno di 3 giorni a 20-25°C per rilevare la presenza di muffe e non meno di 3 giorni a 30-35°C per rilevare la presenza di batteri. Venne rilevata la presenza di microrganismi durante il campionamento in due casi di manipolazione di fiasche mentre nella manipolazione delle cell factory non venne rilevata alcuna contaminazione.

Esempio 1. Scongellamento ed amplificazione su scala di laboratorio.

Fu preparata una soluzione di scongelamento composta da terreno IMDM contenente 20% FBS, mantenuta a 4°C fino al momento dell'uso. Un'ampolla contenente le cellule congelate fu prelevata dal bidone dell'azoto e scongelata opportunamente, quindi diluita 1:10 nel terreno di scongelamento. Le cellule vennero centrifugate a bassa velocità per 10'. Il pellet venne risospeso in 10 ml di terreno completo e trasferito in una fiasca T25 con l'aggiunta di IL-2 fino ad una concentrazione di 100 IU/ml.

Le cellule vennero quindi incubate a 37°C per 5 giorni in atmosfera contenente il 10% di CO₂.



Dopo 5 giorni di incubazione le cellule vennero divise 1:2 in terreno fresco contenente la stessa concentrazione di interleuchina 2 e vennero quindi lasciate crescere fino a raggiungere la confluenza, mantenuta per 2 giorni. Le cellule furono delicatamente staccate dalla fiasca e trasferite in una T75 contenente 20 ml finali di terreno e la stessa concentrazione di IL-2 (100 IU/ml). Una volta raggiunta la confluenza in circa 2-3 giorni, le cellule vennero lasciate ulteriori 2 giorni e quindi amplificate in una T175 con un volume finale di 40ml ed interleuchina 2 (100IU/ml). Dopo due giorni vennero aggiunti altri 40 ml di terreno completo di interleuchina, le cellule furono lasciate crescere altri due giorni e quindi divise 1:2 in altre 2 T175 in un volume finale di 80 ml/T175.

Le cellule vennero controllate al microscopio per verificarne la morfologia e la densità e quindi portate ad un volume finale di 150 ml/fiasca in terreno completo (IMDM contenente siero umano AB) al 5% ed aggiungendo IL-2 in proporzione.

Le cellule vennero quindi divise 1:2 in altrettante fiasche T175 sempre in un volume finale di 150 ml.

Esempio 2. Crescita dinamica di cellule TALL in fermentatore Miniperm e Spinner flask.

Le cellule vennero scongelate, poste in coltura in T25 ed amplificate fino ad un numero di 7×10^5 cellule/ml per l'inoculo in spinner-flask da 0.5 L, oppure in miniperm.

In fiasca (T75) vennero effettuate alcune misurazioni per impostare i parametri di crescita: le cellule erano divise quando raggiungevano la concentrazione di almeno 1×10^6 /ml. Per mantenere alta la vitalità



cellulare (superiore al 90%) e maggiore la velocità di divisione cellulare, la diluizione delle cellule non fu mai inferiore a 7×10^5 cellule/ml e le cellule non furono mai lasciate crescere oltre 2×10^6 /ml. Alla massima concentrazione di cellule il livello di glucosio era di circa 320-380 mg/ml. In T175, in 80 ml di volume finale, fu raggiunta una concentrazione di 1.25×10^6 cellule/ml, corrispondente ad un totale di circa 100×10^6 cellule/fiasca.

Ai fini di una maggior vitalità durante il congelamento/scongelamento, il minimo numero di cellule per tubo (vial), fu valutato non dover essere inferiore a 1.2×10^7 . Venne inoltre osservato che cellule congelate nella fase logaritmica di crescita raggiungevano a loro volta la fase di crescita logaritmica dopo scongelamento, in 9-10 giorni, mentre cellule congelate in altre fasi del ciclo di crescita avevano un "lag period" superiore (10-12 giorni).

Spinner flask. La Spinner flask pari a 0.5 L aveva un volume di lavoro di 300 ml. L'inoculo fu effettuato con 1.5×10^7 cellule; la velocità di agitazione fu impostata pari a 3 rpm; la vitalità cellulare fu misurata dopo 48 ore e fu trovata pari al 50%. Dopo 120 ore le cellule erano completamente morte.

Furono inoltre effettuate 3 prove di amplificazione in Miniperm (bioreattore ad alta superficie rispetto al volume, ideale per l'espansione di cellule in sospensione come gli ibridomi) utilizzando una percentuale di CO_2 pari al 10% e le seguenti condizioni specifiche:

- inoculo a 7×10^7 cellule, in 30 ml a 10 rpm. La vitalità cellulare cominciò a scendere già dopo 48 ore e le cellule risultarono



completamente morte dopo 4 giorni. Nella seconda prova la velocità di rotazione fu diminuita a 5 rpm. Al terzo giorno di crescita la vitalità cellulare era del 52%, e le cellule erano completamente morte al 6° giorno. Nella terza prova l'inoculo fu diminuito a 3×10^7 cellule e la velocità di rotazione fu portata a 4 rpm. Sebbene tutte le cellule fossero morte entro il 5° giorno di coltura, al 2° giorno la vitalità cellulare era ancora piuttosto alta, e pari all'80% suggerendo un ruolo importante dell'agitazione nella sopravvivenza di tali cellule.

Entrambe le prove di fermentazione preliminari avevano dimostrato che le cellule T-ALL non riuscivano a crescere nelle condizioni di crescita su larga scala tradizionali normalmente utilizzate per cellule in sospensione o anchorage-independent.

Esempio 3. Amplificazione su scala industriale di TALL in cell-factory.

250 ml di sospensione cellulare ottenuti dalla crescita in T175 secondo quanto descritto nell'esempio 1, e contenente circa 0.8×10^6 cellule/ml, vennero inoculati in una cell-factory a 10 ripiani aggiungendo altrettanto volume di terreno completo A distanza di 4 giorni vennero aggiunti 500 ml di terreno completo per tre volte, fino ad un volume totale di 2 L.

La cell-factory venne svuotata in tubi sterili da 250 ml che vennero centrifugati e quindi lavata con PBS sterile, recuperando le cellule in tubi e ri-centrifugando. Da una cell-factory vennero recuperate circa 2.35×10^9 cellule a 8 giorni dall'inoculo.

In un ciclo di produzione tipico in cell-factory a 10 ripiani si effettuarono 72 inoculi ed amplificazioni da un solo tubo congelato di MCB (master



Cell Bank), per una durata totale di 120 giorni, per un totale di 144 litri di coltura cellulare, ottenendo circa 1.44×10^{11} cellule.

In tabella 1 sono riportati i dati ottenuti da una fermentazione in cell-factory a 10 ripiani ed in una a 40 ripiani.

Tabella 1. Confronto tra il rendimento in cell-factory 10 e a 40 ripiani.

| | Cell factory 10 (2 Litri) | Cell factory 40 (8 Litri) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| N inoculi | 72 | 31 |
| Giorni | 120 | 120 |
| Volumi (Litri) | 144 | 248 |
| N cellule | 1.44×10^{11} | 2.48×10^{11} |

Il contenuto di cellule della cell-factory venne riunito in un tubo sterile da 50 ml e quindi irraggiato come noto, in un acceleratore di particelle beta (Betatrone). Il metodo fu validato precedentemente in modo da fornire una quantità di particelle pari a quelle erogate da una sorgente tradizionale come Cs137. Il metodo che utilizza il betatrone ha il vantaggio di non essere radioattivo e di irraggiare la soluzione in modo uniforme.

Preparazione delle sacche. Una volta irraggiate le cellule furono centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti. Un campione di cellule venne prelevato per i test qualitativi e quindi mantenute a 4°C fino al momento del congelamento.

Le cellule irraggiate furono trasferite sotto cappa a flusso laminare insieme ai componenti della sospensione finale e alle sacche sterili. Le



cellule furono risospese nella soluzione di congelamento costituita dal 20% Rimso 50 (DMSO 50%) e dal 80% di Albumina umana al 5% in funzione della quantità di cellula richiesta dalla dose terapeutica. Le cellule furono contate al microscopio nella camera di Burkner e le sacche riempite sterilmente con il volume prescritto. Dopo il riempimento le sacche vennero sigillate avendo cura di saldare in tre punti il tubicino di riempimento formando così un campione autentico di ogni sacca.

Il ciclo Cell Factory > irraggiamento > bags viene ripetuto un numero di volte sufficiente a ottenere il numero di cellule richiesto dal Lotto.

Controlli di sterilità.

I controlli di sterilità Bioburden, monitoraggio microbiologico e monitoraggio micoplasma vengono continuamente effettuati su terreni e cappe.

Esempio 4. Controlli sul prodotto finito e confronto tra la crescita su scala di laboratorio e quella su scala industriale

Misurazione dei livelli di glucosio: i livelli di glucosio furono rilevati su un campione di 15 fiasche (sulle 35 che corrispondono alla quantità di cellule di una cell-factory) al momento della raccolta di cellule per la preparazione della sacca. Come mostrato in figura 1 la variabilità di concentrazione di glucosio e del numero di cellule è molto alta mentre in cell factory a 10 ripiani al momento della raccolta (harvest) (dopo 6-10 giorni) il glucosio ha un unico valore (intorno a 380 mg/dl) e le cellule hanno una densità unica pari a 2×10^9 /ml. I diversi livelli di glucosio e le diverse concentrazioni di cellule rilevati in fiasca sono indicativi di condizioni metaboliche disomogenee: infatti alti livelli di



glucosio nel terreno correlano con una bassa attività metabolica della coltura cellulare, mentre bassi livelli di glucosio corrispondono ad una coltura cellulare ad alta attività metabolica.

Controllo di Qualità sul Prodotto Finale.

Le cellule dopo irraggiamento subiscono i controlli riportati in tabella 2: i limiti di accettabilità dei valori sono riportati nella colonna di destra.

Tabella 2

| Saggio | Metodo | Limiti |
|--------------------|--|--|
| Vitalità | Test d'esclusione con Trypan Blu | > 80 % |
| Attività Biologica | Test di Citotossicità | > 60 % Lisi delle Cellule Target K562 al rapporto 10/1 |
| Endotossine | Lymulus Amebocyte Lysate colorimetrico | ≤ 0,5 EU/mL |
| Fenotipo | Immunofluorescenza (FACS) | ≥ 90 % CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD56 ⁺ |
| Proliferazione | Incorporazione di ³ H-TdR | ≤ a 2 volte il background dopo 4 giorni di incubazione |

Test di vitalità

La determinazione fu effettuata diluendo 100 µl di sospensione cellulare prima dell'insaccamento con 100 µl di una soluzione di Trypan Blu. Diluire opportunamente e controllare al microscopio contando con l'ausilio della camera di Burker le cellule in cui è penetrato il colorante.

Attività Biologica.

La determinazione della citotossicità venne effettuata sulla sospensione cellulare prima dell'insaccamento, con un Kit Toxilight (BioWhittaker

LT07-217). Il metodo si basa sulla misura della adenilato kinasi attraverso la bioluminescenza. La adenilato kinasi viene rilasciata dalle cellule quando perdono l'integrità di membrana e converte l'ADP del substrato ad ATP in presenza di Mg^{++} permettendone la misura. La determinazione venne effettuata piastrando 10^5 cellule bersaglio K562 in diversi pozzetti di una micropiastra, aggiungendo le cellule preparate secondo il metodo in quantità di 10^6 , 5×10^5 e $2,5 \times 10^5$ in modo da avere rapporti T/K (o effetto/target, pari rispettivamente a 10, 5 e 2,5.

Dopo incubazione overnight con le cellule target la percentuale di lisi di K562 effettuata da cellule preparate in accordo con il metodo della presente invenzione, è sempre risultata $\geq 70\%$ del massimo costituito da un campione di 10^5 cellule K562 lisate con gli ultrasuoni.

Endotossine.

La determinazione del contenuto di endotossine venne effettuata su un campione dai collarini preparati come su riportato, a pH neutro utilizzando un Kit per il LAL test cromogenico e applicando il metodo descritto in "European Pharmacopoeia" 4th Edition 2002 pag 140-145.

Fenotipo.

La determinazione del Fenotipo mediante misurazione dei marcatori cellulari prima dell'insaccamento venne effettuata per Immunofluorescenza (FACS) con marcatori immunologici appropriati ($CD3^+$, $CD8^+$, $CD56^+$) dai laboratori Controllo qualità della Società Molmed.

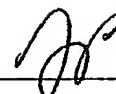


Tabella 3. Valori dei marcatori fenotipici di cellule T-All cresciute in fiasca ed in cell-factory al momento della raccolta delle cellule.

| Amplificazione | CD3 | CD8 | CD56 | Att. citotox | H3 timidina |
|------------------|-------|-------|-------|--------------|--|
| Fiasca | > 90% | > 90% | > 90% | - | ≤ a 2 volte il background dopo 4 giorni di incubazione |
| Cell-factory avg | > 98% | > 93% | ≥ 97% | ≥ 70% | ≤ a 2 volte il background dopo 4 giorni di incubazione |
| Lotto 1 pre | 99% | 90 | 98 | | |
| post | 99% | - | 99 | | |
| Lotto 2 pre | 99 | 98 | 99 | | |
| post | 99 | 93 | 99 | | |
| Lotto 3 pre | 99 | 97 | 92 | | |
| post | 99 | 94 | 95 | | |

Pre: pre-irraggiamento; Post: post-irraggiamento; Avg: media.

Test di Proliferazione.

La determinazione dell'assenza di proliferazione delle T-ALL viene effettuata con la misura della incorporazione di timidina triziata. Un campione della sospensione cellulare prelevato prima dell'insaccamento viene incubato in micropiastre a diverse concentrazioni per 4 giorni in terreno completo (IMDM + siero + IL2). Si aggiunge 3H-TdR (2 µCi/ml, 50 µl/pozzo) e dopo incubazione per 3 h a 37°C misurare la radioattività. Le cpm relative alle TALL devono essere ≤2 volte il fondo.

I dati relativi alla proliferazione di un batch di cellule cresciuto in fiasca ed in cell factory sono riportati in tabella 3.

In tabella 4 sono inoltre riportati i dati relativi alla misurazione (su diverse preparazioni) della presenza dei marcatori immunologici, della vitalità



[Handwritten signature]

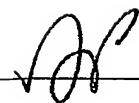
cellulare, della sterilità e di eventuale contaminazione da micoplasma,
dopo irraggiamento della coltura.

Tabella 4. Misura dei marcatori su cellule TALL dopo irraggiamento.

| | | | Citofluorimetria | | Incorp. 3H Timidina | | | |
|-------------|-------------------|-------|------------------|-------|---------------------|-------|-----------|----------|
| N° campioni | cellule | CD3 | CD8 | CD56 | campione | fondo | Sterilità | myco |
| 2 | $2,5 \times 10^9$ | 99,59 | 94,8 | 92,51 | 24 | 27 | OK | negativo |
| 6 | $2,5 \times 10^9$ | 99,8 | 91,34 | 97,17 | 33 | 27 | OK | negativo |
| 8 | $2,5 \times 10^9$ | 99,88 | 93 | 97,84 | 37 | 26 | OK | negativo |
| 18 | 1×10^8 | 99,59 | 94,8 | 92,51 | 24 | 27 | OK | negativo |
| | | | Citofluorimetria | | Incorp. Timidina | | | |
| N° campioni | cellule | CD3 | CD8 | CD56 | campione | fondo | Sterilità | myco |
| 1 | $2,5 \times 10^9$ | 99,54 | 94,63 | 95,83 | 23 | 24 | OK | negativo |
| 1 | $2,5 \times 10^9$ | 99,44 | 96,24 | 98,51 | 37 | 26 | OK | negativo |
| 8 | 1×10^8 | 99,54 | 93,36 | 99,79 | 34 | 25 | OK | negativo |
| | | | Citofluorimetria | | Incorp. Timidina | | | |
| N° campioni | cellule | CD3 | CD8 | CD56 | campione | fondo | Sterilità | myco |
| 7 | $0,5 \times 10^9$ | 99,8 | 92,3 | 97,05 | 82 | 60 | OK | negativo |
| 11 | $0,5 \times 10^9$ | 99,54 | 93,36 | 99,79 | 29 | 29 | OK | negativo |

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per espandere linfociti TALL caratterizzato dal fatto che almeno 1×10^9 cellule sono cresciute in un sistema di coltura omogeneo.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 dove tale sistema di coltura omogeneo è la cell-factory.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2 dove l'espansione nel sistema omogeneo è preceduto da una pre-espansione in fiasca fino all'ottenimento di un numero di cellule compreso tra $0.7-1 \times 10^8$.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 3 dove la densità cellulare di inoculo non è mai inferiore a 0.7×10^6 cellule/ml, preferibilmente è di 0.75×10^6 cellule /ml ed al momento della raccolta la densità è inferiore a 2×10^6 cellule /ml, preferibilmente di 1×10^6 .
5. Procedimento secondo la rivendicazione 2 dove la cell-factory è a 10 ripiani.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 1 dove i linfociti TALL sono scelti nel gruppo costituito da: TALL-104, TALL-107, TALL-103/2, opzionalmente geneticamente modificati.
7. Procedimento secondo le rivendicazioni 1-6 caratterizzato dal fatto che il terreno di coltura completo nella fase di amplificazione in cell-factory comprende inoltre siero umano in percentuale inferiore al 10%, preferibilmente compresa tra 4-6%, ancor più preferibilmente 5%, opzionalmente siero fetale in concentrazione compresa tra 0 e 10% e interleuchina in concentrazione di 100/IU
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto



che l'interleuchina 2 viene aggiunta ogni 48-90 ore alla coltura cellulare.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la crescita cellulare nel sistema omogeneo avviene in terreno di coltura privo di antibiotici.
10. Procedimento per la preparazione di sacche congelate di linfociti TALL in quantità di almeno 1×10^9 cellule caratterizzato dal fatto che tale quantità è ottenuta con un singolo sistema di coltura omogeneo.
11. Procedimento secondo la rivendicazione 10 caratterizzato dal fatto che tale procedimento omogeneo è in accordo con le rivendicazioni 1-9.
12. Procedimento secondo la rivendicazione 11 dove la sacca è saldata trasversalmente al collarino di riempimento della sacca stessa in almeno due punti, tali saldature effettuate in modo da generare almeno una camera campionatrice contenente un volume di coltura cellulare compreso tra 0.1 ed 1 ml, fisicamente separati dalla coltura contenuta nella sacca per effettuare controlli di qualità.
13. Procedimento per la preparazione di una dose di almeno 1×10^9 linfociti TALL in coltura omogenea, dove tali linfociti sono caratterizzati dall'espressione dei marcatori immunologici CD3 e CD8 in percentuale superiore o uguale al 98%, preferibilmente $\geq 99\%$ e CD56 espressi almeno al 95%, preferibilmente $\geq 97\%$.
14. Procedimento secondo la rivendicazione 13 dove i linfociti sono TALL-104
15. Procedimento secondo la rivendicazione 13 dove tali linfociti sono

caratterizzati da un'attività biologica misurata con un saggio di citotossicità su opportune cellule target pari ad almeno il 70% del controllo.

Milano, li 4 ottobre 2002

p. ABIOGEN PHARMA S.p.A.

il Mandatario

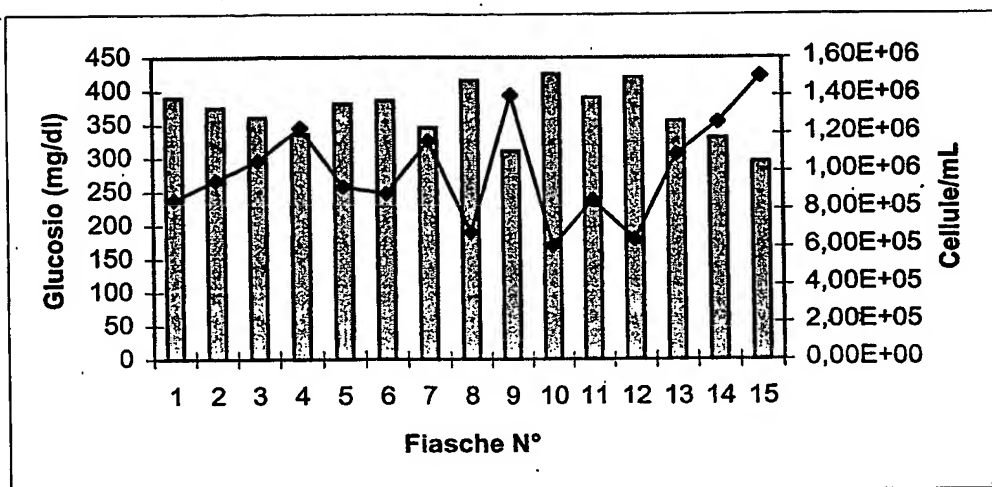



Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

SM





numero di cellule/ml (-♦-,) livelli di glucosio (barra piena).

Figura 1

MI 2002A 002118

